

Aus dem Robert-Koch-Institut Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Georg Henneberg

EINFLUSS DES ERSTEN ANTIGENREIZES
AUF DIE WEITERE IMMUNISIERBARKEIT

(Versuche mit Poliomyelitisvirus-Impfstoffen an Meerschweinchen)

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

1960

vorgelegt von

Jürgen Sandow

aus Berlin



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Robert Koch-Institut Berlin

Direktor Prof.Dr.med. Georg Henneberg

EINFLUSS DES ERSTEN ANTIGENREIZES
AUF DIE WEITERE IMMUNISIERBARKEIT

(Versuche mit Poliomyelitisvirus-
Impfstoffen an Meerschweinchen)

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jürgen Sandow
Berlin

Dekan: Professor Dr.med. Hans Wolfgang S p i e r
Referent: Professor Dr.med. Georg H e n n e b e r g
Korreferenten: Priv.Doiz.Dr.med. Volker L e n k
Professor Dr.med. Bernhard S c h m i d t

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 16. Januar 1968



INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
<u>Schrifttumsverzeichnis</u>	4-8
 <u>Text der Arbeit</u>	
Theoretische Fragestellung	
Impfpraxis	9
Bedingungen des ersten Antigenreizes	9-13
Auswahl des Impfstoffs für die Versuche	13-14
Wirkung sehr kleiner oder sehr großer Antigenreize	15-17
Adjuvantien	18-20
Zweckmäßige Art der ersten Immunisierung	20-21
 Versuche	
Erster Versuch zur Feststellung des quantitativen Einflusses der Antigenkonzentration auf die Antikörperbildung beim Meerschweinchen	22
Material und Methoden	22-23
Ergebnisse von Versuch 1	24-25
Kritik	25-26
Zweiter Versuch zur Feststellung der Wirkung qualitativ verschiedener Erstreize bei konstanter Antigendosis	26-27
Impfstoffherstellung	28
Versuchsanordnung und -verlauf	29-30
Statistische Auswertung	30-32
Tabellen und Schaubilder	32-36
Ergebnisse	37-39
Beurteilung der Versuchsergebnisse	40-42
 Zusammenfassung	
Einfluß von Verdünnung des Antigens - Einfluß von Adsorption an Depotmaterialien - Hypothese vom Antigen-Dauerreiz als günstigen Erstreiz	43-44
 <u>Lebenslauf</u>	45

Schrifttumsverzeichnis

- (1) BARNET, E. and S.BARON: Antibody-response to increased amounts of Poliomyelitis vaccine. Amer. J. Hyg. 71, 59 (1960)
- (2) BATSCHELET, E.: in: Wissenschaftl. Tabellen J.R. Geigy-S.A., Basel 1960
- (3) BREINL u. HAUROWITZ, F.: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 192, 45 (1930)
- (4) BURNET, M.F. and M. FENNER: The production of Antibody. Macmillan (Verl.), London (1949)
- (5) BURNET, M.F.: The clonal selection theory of acquired immunity. Vanderbilt Univ. Press, Nashville/Ten. (1959)
- (6) COONS, A.H., LEDUC, E.H. and M.H. KAPLAN: J. exp. Med. 93, 173 (1951)
- (7) COONS, A.H., LEDUC, E.H. and M.H. KAPLAN: Symp. Soc. exp. Biol. 6, 166 (1952)
- (8) CUSHING, J.E. and D.H. CAMPBELL: Principles of immunology, Mac Graw-Hill (Verl.) New York - Toronto - London (1957)
- (9) DANE, D.S., DICK, C.W.A., McALISTER, J.J. and R.T. NELSON: Epidemic control of poliomyelitis with inactive virus vaccines. Studies in cynomolgus monkeys. Lancet 1960 I, 845
- (10) DRESCHER, J.: Adsorptionsvorgänge bei Virusarten. 1. Mitteil.: Aufnahme der Adsorptionsisotherme und Prüfung des Einflusses des pH-Wertes und der Molartität für das System PR8-Influenzavirus- γ -Aluminiumoxyd. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 188, 217-234 (1957)
- (11) DRESCHER, J.: Über die Bez. zwischen Antigenzufuhr u. Antikörper-Bildung. I.: Beschr. einer Methodik zur Gewinnung hochtitriger Immunsereen mittels Antigen-dauerreizen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 177, 149-160 (1960)
- (12) DRESCHER, J.: Comparison of the adsorption of influenza virus strain B/Berlin/2/55 on aluminum oxide and on aluminum hydroxid. Amer. J. Hyg. 74, 104-118 (1961)
- (13) DRESCHER, J.: γ -Aluminum-oxide as an adjuvant for inactivated poliovirus vaccines. Am. J. Hyg. 75, 147-157 (1962)
- (14) DRESCHER J. u. D. JACHERTS: Antikörper-Synthese in vitro: 3. Bildung eines Antikörper-analogen Produktes (AAP) nach Stimulierung mit Influenzavirus-Antigen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 199, 315-328 (1966)

- (15) DRESSER, D.W.: Specific Inhibition of Antibody-Production: Protein-overloading Paralysis: Immunology 5, 161 (1962)
- (16) DRESSER, D.W.: Specific Inhibition of Antibody-Production: Paralysis induced in adult mice by small quantities of protein-Antigen. Immunology 5, 378 (1962)
- (17) DUNCAN, D.B.: Multiple range and multiple F-tests, Biometrics 11, 1-42 (1955)
- (18) DUNCAN, D.B.: Multiple range tests for correlated and heteroscedastic means. Biometrics 13, 164-176 (1957)
- (19) DUTTON, R.W. and J.D. EADY: Immunology 7, 40 (1964)
- (20) EHRLICH, E.W.: Morphologie u. Physiologie der Antikörperbildung: Verh. dtsh. path. Ges. 1962
- (21) FISHER, R.A. und F. YATES: Statistical tables for biological, agricultural and medical research, 5th ed., Oliver and Boyd (Edinburgh) 1957
- (22) FREUND, J.: The effect of paraffin oil and mycobacteria on antibody-formation and sensitization. Amer. J. Clin. Path. 21, 645 (1951)
- (23) FRICKE, R., NIEMANN, F. und C. FEICHTNER: Über die Primärteilchengröße und Sekundärstruktur sowie den Wärmehalt verschiedener aktiver γ -Aluminiumoxyde. Ber. dtsh. chem. Ges. 70, 2318-2330 (1937)
- (24) GARD, S.: The virus of Poliomyelitis. In: D. HALLAUER u. K.F. MEYER: Handb. d. Virusforschung, Bd. 4, 581, Springer (Verl.) Wien 1958
- (25) GARD, S.: Theoret. Überlegungen zur Inakt. von Viren durch chem. Mittel, Ann. New York Acad. Sci. 83, 638-48 (1960)
- (26) GRÜTZNER, L. in: HENNEBERG, G. und H. KÖHLER: Praktikum der Virusdiagnostik, 64, Fischer-Verl. Stuttgart 1961
- (27) HAAS, R. u. V. DOSTAL: E. Beitr. zur Frage der inaktivierenden Wirkung von Aluminium-Hydroxid auf Poliomyelitisvirus. Behringwerk-Mitteilungen Heft 36, 11-21 (1959)
- (28) HAAS u. R. THOMSEN: Entwicklungsstand d. in d. Immunbiol. gebräuchlichen Adjuvantien: Ergebn. Mikrobiol. 34, 25 (1961)
- (29) HAAS, R.: Inaktivierung als Problem der Impfstoffherstellung. 28. Tag. d. Dtsch. Ges. für Hyg. u. Mikrobiol. 1961. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 184, 119 (1962)

- (30) HARTER, H.L.: Critical Values for DUNCAN's new multiple range test. *Biometrics* 16, 4 (1960)
- (31) HAUROWITZ, F.: "Rôle of the Antigen in Antibody-Formation" in: *Immunchemie* (15. Coll. Ges. Physiol. Chem. Mosbach) 241 (1965)
- (32) HAUROWITZ, F.: *J. Immunol.* 94, 938-940 (1965)
- (33) HENNEBERG, G.: Die Wirkung der Penicillintherapie auf den Gehalt an komplementbindenden Antikörpern bei der Gonorrhoe. *Arch. Klin. exp. Derm.* 187, 350-359 (1948)
- (34) HENNEBERG, G. u. E. WENGEL: Zur Depotwirkung d. Grippeadsorbatimpfstoffes. *Arch. ges. Virusforsch.* 5, 237 (1953)
- (35) HENNEBERG, G. u. J. DRESCHER: Untersuchungen ü. Depotimpfstoffe. I. Mitteilg.: Unters. über d. Verlauf der γ -Aluminiumoxidresorption aus Depots von PR 8-Influenzavirus- γ -Aluminiumoxidimpfstoffen *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 167, 310-326 (1957)
- (36) HENNEBERG, G.: Über Adjuvantien bei Poliomyelitis-Impfstoffen. *Proc. Vith Symposium of the European Association for Poliomyelitis, Munich, September 7-9th 1959. Vol. VI, 470* (1959)
- (37) HENNEBERG, G.: Antigendauerreiz. *Münch. Med. Wschr.* 102, 2223-27 (1960)
- (38) HENNEBERG, G., DRESCHER, GODGLÜCK u. GRÜTZNER: Immunogenic activity of aqueous and aluminum-oxide-adsorbed poliovirus vaccine in macaca mulatta. *Am. J. Hyg.* 75, 44-55 (1962)
- (39) HERRLICH, A.: (Herausg.) *Handb. der Schutzimpfungen*, p.13 ff., Springer-Verl. (Berlin-Heidelberg) 1965
- (40) HOWE, H.: The quantitation of poliomyelitis virus in the human alimentary tract with reference to coexistence of homologous serum neutralising antibody. *Amer. J. Hyg.* 75, 1 (1962)
- (41) KELLER, W. u. R. SAUTHOFF: *Klin. Wschr.* Nr. 29/30, 732 (1955)
- (42) KEULS, M.: The use of the "Studentized Range" in Connection with an Analysis of Variance. *Euphytica* 1, 112-122 (1952)
- (43) KIRBY, D.R.S.: *Nature (Lond.)* 187, 707 (1960)
- (44) LANGE, F.C.: Über den Einfluss der Gewebe-Organisation auf die Wirksamkeit des Adsorbens in einem Depot-Impfstoff. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* 175, 198-213 (1959)
- (45) LEDUC, E.H., COONS, A.H. und J.M. CONNOLLY: *J. exp. Med.* 102, 61 (1955)
- (46) LETTERER, E.: *Allg. Pathologie*, 650, Verlag Thieme, Stuttgart (1959)

- (47) LINDER, A.: Statistische Methoden, Birkhäuser (Verl.), Basel 1964
- (48) MAKINODAN, T., HOPPE, I., SADO, T., CAPALBO, E.E. and M.R. LEONARD: J. Immunol. 95, 467-479
"The suppressive effect of supraoptimum doses of antigen on the secondary antibody forming response of spleen-cells cultured in cell-impermeable diffusion chambers."
from Biol. Div. Oak Ridge Nat. Lab., Oak Ridge/Ten.
- (49) McKINNEY, R.W. and F.M. DAVENPORT: Studies on the mechanism of action of emulsified vaccines.
J. Immunol. 86, 90 (1961)
- (50) MILLER, J.J.: J. Immunol. 93, 251 (1964)
- (51) MORGAN, J.F., MORTON, H.J. and R.C. PARKER:
Nutrition of animal cells in tissue culture.
I. Initial studies on a synthetic medium
:Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 73, 1-8 (1950)
- (52) NEWMAN, D.: The distribution of the range in samples from a Normal Population, expressed in terms of an independent estimate of standard deviation,
Biometrika 31, 20-30 (1939)
- (53) NOSSAL, G.J.V. and O. MÄKELÄ: Ann. Rev. Mikrobiol. 16, 53 (1962)
- (54) PAULING: J. Amer. chem. Soc. 62, 2643 (1940)
- (55) RICHTER, M. and F. HAUROWITZ: J. Immunol. 84, 420 (1960)
- (56) SALK, J.E.: e.a.: Studies in human subjects on active immunity against poliomyelitis: Am. J. publ. Health 44, 994 (1954)
- (57) SALK, J.E., YOUNGER u. WARD: Use of color change of phenol red as an indicator in titrating poliomyelitisvirus: Am. J. Hyg. 60/2, 214-230 (1954)
- (58) SALK, J.E.: Requirements of persistent immunity to poliomyelitis: Am. J. med. Sciences 232, 369 (Oct. 1956)
- (59) SALK, J.E.: Preconceptions about vaccination against paralytic poliomyelitis: Ann. intern. Med. 50/4, 843 (1959)
- (60) SALK, J.E.: Persistence of immunity after administration of formalin-treated poliovirus-vaccine.
Lancet 1960 II, 175
- (61) SALK, J.E.: Poliomyelitis immunization and the Herd Effect, Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 191, 69 (1963-64)
- (62) SCHLESINGER, H.: J. nat. Cancer Inst., 28, 927 (1962)

- (63) SERCARZ u. COONS: Nature (Lond.) 184, 1080 (1959)
- (64) SERCARZ u. COONS in: HASEK, LENGEROVA u. VOJTISKOVA: Mechanisms of Imm. Tolerance. The Czechoslovak Academy of Sciences Press, Prag 1962
- (65) TERRES, G. and W. WOLINS: Enhanced imm. sensitization of mice by the simultaneous injections of antigen and specific antiserum. J. Immunol. 86, 361-368 (1961)
- (66) VOSS, H. und U. TOLKI: Über ein ca. 1 Jahr altes Impfstoffgranulom beim Menschen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 178, 291 (1960)
- (67) WEBER, E.: Grundriss d. biol. Statistik, 4. Aufl. Fischer-Verl. Jena 1961
- (68) WILLSTÄTTER, R. u. O. ERBACHER: Über isomere Hydrogele der Tonerde. Chem. Ber., VII. Mitteilg. 58, 2448 (1925)
- (69) WILNER, I., EVERS, M.A., TROUTMAN, H.D., TRADER, F.W. and I.W. McLEAN: Vaccine potentiation by emulsification with pure hydrocarbon compounds. J. Immunol. 91, 211 (1963)
- (70) WHITE, R.G.: Nature (Lond.) 182, 1383 (1958)
- (71) WHITE, R.G.: in "The immunologically competent cell", Churchill Verl. London, 7-19 (1963)
- (72) WHITE, R.G. and WILKINSON: Immunology 11, 239 (1966)
- (73) YOUNGER, S. and V. AXELROD: The characteristics of lipid-adsorbed vaccines. J. Immunol. 90, 1 (1963)

THEORETISCHE FRAGESTELLUNG

Impfpraxis

Vielfach sind bei der Anwendung bestimmter Impfmethoden zur künstlichen Immunisierung zunächst weder die auszuwählenden Antigene, noch der optimale Impfmodus bekannt, beide werden meist empirisch bestimmt, und aus den Erfolgen wird auf eine Zweckmäßigkeit des zugrundegelegten Prinzips geschlossen.

Für die Impfpraxis sind die Fragen der praktischen Durchführung einer Impfkation wichtig: In welchem Lebensalter soll zum ersten Mal geimpft werden, in welcher Darreichungsart hat die erste Impfung zu erfolgen, wenn sie eine stabile Grundimmunität hervorrufen soll, wie oft muß diese Impfung zum Aufbau eines Infektionsschutzes wiederholt werden, wann soll, falls nötig, eine Wiederholung der Impfung zur Auffrischung des Infektionsschutzes erfolgen?

Gelingt es, die Kenntnis der Vorgänge bei der Grundimmunisierung zu erweitern, so wird die Auswahl eines optimalen Impfmodus erleichtert.

Bedingungen des ersten Antigenreizes

Eine bestimmte antigene Substanz kann, je nach ihrer Antigen-Wirksamkeit und Verweildauer an bestimmten Orten des Körpers, zur Entstehung ganz verschieden hoher Antikörpertiter Anlaß geben. Höheres Molekulargewicht verlängert die Verweildauer im Blut und begünstigt den Kontakt mit Antikörper bildenden Zentren sowie die Aufnahme in Antigen speichernde Zellen. Antigene, die aus der Blutbahn oder den Zellen schnell eliminiert werden, veranlassen nur geringe Antikörperbildung. Die quantitative Wirksamkeit eines Antigens ändert sich bei gleicher Natur des Antigens mit

seiner Darreichungsform (Qualität) und wechselt je nach der im Versuch verwendeten Tierart, d.h. den spezifischen Eigenschaften der zur Antikörper-Bildung befähigten Zellen. Um die von einem Antigen ausgelösten Vorgänge der Proteinsynthese quantitativ zu verfolgen, kann die Wirksamkeit eines Antigens definiert werden als die pro zugeführter Antigeneinheit gebildete Antikörpermenge. LETTERER (46) wertet als besonderes Merkmal der Antikörper-Bildung, daß die Menge der Antikörper diejenige der aufgenommenen Antigene und deren Verweildauer im Blut bei weitem übersteigt. Bei erstmaligem Kontakt eines Individuums mit einem bestimmten, nicht vermehrungsfähigen Antigen kommt es nach der ersten Gabe nach einer bestimmten Latenzzeit zum allmählichen Anstieg der spezifischen Antikörper. Erfolgt keine neue Antigenverabreichung, so lassen sich nach einiger Zeit keine freien Antikörper mehr im Blut nachweisen. Wird nach dieser Primärphase eine zweite und dritte Antigenmenge verabreicht (injection de rappel), so steigt der Antikörpertiter unvermittelt rasch und hoch an (Sekundärphase oder booster-effect). Bei genügend rascher und häufiger Titerbestimmung kurz nach der zweiten Injektion fällt eine initiale Depression des Antikörpertiters auf, d.h. in den ersten 24-48 Stunden nach der erneuten Antigenverabreichung sinkt der Titer erheblich ab, um dann erst über das Niveau der Primärphase anzusteigen. Es kommt zur Komplexbildung zwischen neuzugeführtem Antigen und vorhandenen Antikörpern, damit zu deren vorübergehenden Verschwinden aus dem Blut. Die Antigen-Antikörper-Komplexe bilden nach HAUROWITZ bei Beginn der Sekundärreaktion ein natürliches Adjuvans, sie formen gelöste Antigene zu korpuskulären um und erhöhen bei korpuskulären Antigenen erheblich die Teilchengröße, erleichtern also im Sinne der Phagozytose die zelluläre Antigenaufnahme. Entsprechend fanden TERRES und WOLINS eine beschleunigte Immunitätsreaktion bei Zufuhr von Antigen und spezifischem Antiserum bei Antigen-Überschuß (65). SALK (58, 60) weist für die Schutzimpfung gegen eine natürliche Infektion (exposition) darauf hin, daß nach einmaliger Impfung auch

in Abwesenheit nachweisbarer Antikörper eine Bereitschaft zu immunologischer Hyperreaktivität bestehen kann. Auf das Eindringen des spezifischen Erregers wird bei solchen Personen ohne nachweisbare Serumantikörper genügend rasch Antikörper gebildet, um die Toxine des Erregers zu neutralisieren oder seine Verbreitung zu hemmen. HERRLICH (39) unterscheidet eine zentrale von einer lokalen Gewebeimmunität. Während die letztere ihr Wesen hat in zellständigen Antikörpern, die als Grundlage der Reaktion vom Tuberkulintyp (delayed hypersensitivity type) dienen, wird unter zentraler Gewebeimmunität eine nicht präzise definierte mesenchymale Umstimmung verstanden, die bei einer 2. Infektion noch nach Verschwinden nachweisbarer Serumantikörper den Ausbruch der Infektionskrankheit verhindert. "Viele Beobachtungen weisen darauf hin, daß diese zentrale Immunität in den Antikörper bildenden Mesenchymzellen lokalisiert und genetisch verankert ist." Wichtig erscheinen in diesem Zusammenhang die Ergebnisse von HAUROWITZ (32), daß auch nach mehreren Monaten bis zu zwei Jahren Spuren des verabreichten Antigens in den Mesenchymzellen nachweisbar bleiben (allerdings in der Größenordnung 1 % von ursprünglichen 100 %). Mit empfindlichen Methoden sind auch bei einmaliger Antigengabe nach Monaten noch Spuren von Antikörpern nachweisbar (55).

Während über die chemische Natur der Antikörper weitgehende Klarheit besteht - es handelt sich um Eiweisskörper vorwiegend aus der γ -Fraktion der Serumglobuline -, werden sowohl ihre Bildungsstätten als auch der zugrundeliegende Mechanismus noch diskutiert. COONS e.a. kamen bei Untersuchungen mit fluoreszierenden Antikörpern (6,7) sowie aufgrund der Zunahme der Basophilie und Pyroninfärbbarkeit in unmittelbarer Kongruenz mit dem Gehalt an Antikörpern (45) zu der Annahme, daß Plasmazellen zur Antikörper-Bildung befähigt sind. Diese Plasmazellen wurden aufgefunden in der roten Milzpulpa, in den Markfeldern von Lymphknoten und im periportalen Bindegewebe. WHITE beobachtete eine charakteristische retikuläre Anordnung von Antikörpern in den Makrophagen und im retikulären

Gewebe der MALFIGHI'schen Körperchen der Milz, weist aber auf die intensive Lymphozyten-Proliferation in enger Nachbarschaft der Keimzentren hin und schlägt einen verbindenden Mechanismus vor, durch den von den Makrophagen her die Lymphozyten "instruktiv" oder "selektiv" beeinflusst werden (70,71). Es gibt im wesentlichen drei Theorien bezüglich der Stätten der Antikörperbildung: 1) die retikuloendotheliale, 2) die lymphozytäre und 3) die plasmacelluläre. (8,20)

Über den Mechanismus der Antikörperbildung existieren mehrere Theorien. HAUROWITZ und BREINL (3,31) nehmen einen Einfluß des Antigens auf die Proteinsynthese (Globulin) im Sinne einer Matriztheorie an (template theorie). Für die Antikörper-Synthese ist das Verbleiben von Spuren des Antigens im Organismus Bedingung, entsprechend dessen determinanten Gruppen, da die Synthese nur in Gegenwart der Prägeform abläuft. Entsprechende Befunde wurden von HAUROWITZ e.a. (32) auch erhoben. Das Antigen beeinflusst die Antikörper-Synthese "instruktiv", es muß für die Globulinsynthese anwesend sein. Nach PAULING (54) greift das Antigen nur in den Faltungsvorgang nach erfolgter zweidimensionaler Globulinsynthese ein, es bestimmt die Tertiärstruktur. BURNET und FENNER (4) schlagen eine "selektive" Funktion des Antigens vor. Bestimmte mesenchymale Zellen mit vorgebildeter Oberflächenstruktur wählen das passende Antigen aus, ihre Nachkommenschaft produziert dann den entsprechenden spezifischen Antikörper (clonal selection theorie). Diese mehrfach modifizierte Anschauung (5) macht nach erfolgter Selektion die weitere Anwesenheit von Antigen nicht zur Bedingung; das Antigen hat dem Zellklon die Information übergeben, dieser trägt sie weiter.

Im Säuglingsalter sind, wie viele andere Mechanismen, die aktiven Immunitätsphänomene eine werdende Funktion. Die Fähigkeit zu selbständiger Beantwortung von Infektionsallergenen (Bakterien und Viren) soll erst erworben werden.

(5)

BURNET weist auf das biologische Grundproblem der Unterscheidung zwischen "self" und "not-self" hin. Mit der Entwicklung eines Systems von immunologisch kompetenten Zellen wird die Möglichkeit zu dieser Unterscheidung geschaffen. Die Vielfalt und die Menge der Antikörper nimmt dann im Laufe der Entwicklung des Kindes erheblich zu.

Bei der Immunisierung durch Impfung mit inaktivierten Bakterien oder Viren wird man versuchen, einen Reiz zu schaffen, mit dem der natürliche Infektionsmodus nachgeahmt wird, das zuständige Zellsystem in möglichst großer Breite vom Antigen erreicht wird und in eine optimale Reaktionsgrundlage, auf eine natürliche Infektion zu reagieren, umgestimmt wird (immunologic conditioning). Der bei der Impfung gesetzte Reiz erzeugt in den immunologisch kompetenten Zellen oder in ihren Vorstufen eine bei der Zellteilung weitergegebene Information. Werden genügend viele Zellen von der Information erreicht und veranlaßt, sie weiterzutragen, so ist im Falle der natürlichen Infektion eines so vorbereiteten Organismus die Bildungsgeschwindigkeit der spezifischen Antikörper (Immunogenesis) so schnell in Gang gesetzt, daß das Haften, die Vermehrung und Toxinbildung des Erregers (pathogenesis) gehindert wird (61). Als stabile Grundimmunität wird eine Reaktionsgrundlage des immunisierten Individuums verstanden, die im Fall der natürlichen Infektion ausreichend belastbar ist, um eine Erkrankung zu verhindern.

Auswahl des Impfstoffs für die Versuche

Aus der Fülle von Faktoren, die zur Erzeugung einer stabilen Grundimmunität beitragen, soll dem Thema dieser Arbeit entsprechend am Beispiel der Poliomyelitis-Schutzimpfung mit inaktiviertem Virusmaterial die Bedeutung des ERSTEN Antigenreizes für die weitere Immunisierbarkeit des Individuums untersucht werden, weil aus einer Klarstellung dieses Sachverhaltes einiges für die Impfpraxis Wichtige abgeleitet werden kann.

Als Modell diente die Immunisierbarkeit von Meerschweinchen mit trivalentem, formalininaktiviertem Impfstoff. Dem Impfstoff aus inaktivierten Poliomyelitisviren nach SALK wurde aus technischen Gründen der Vorzug gegeben, weil bei parenteraler Gabe pharmakologisch besser definierte Mengen- und Dosierungsverhältnisse vorliegen als bei oraler Infektion mit Lebendvirus-Impfstoff nach SABIN, COX und KOPROWSKI.

Bei der Fütterung mit abgeschwächten (attenuated) Poliomyelitis-Viren ist über den Anteil des zur Wirkung kommenden Antigens kein Aufschluß zu erhalten. Zwar kommt es unter günstigen Verhältnissen zu einem sich länger hinziehenden Kontakt des vermehrungsfähigen Antigens mit dem Organismus, im ungünstigen Fall wird aber die gesamte Menge an Impfvirus ausgeschieden, ohne wirksam geworden zu sein.

Der anhaltende Kontakt des Antigens kann bei inaktiviertem Impfstoff durch Adsorption an Depotstoffe erreicht werden. Während SABIN den Hauptvorzug der oralen Impfstoffe in der Erzeugung einer örtlichen Immunität der Darmschleimhaut sieht, an der Stelle, wo bei einer natürlichen Infektion die erste entscheidende Schranke das Haften der Viren verhindert, gibt es Hinweise auf eine gleichartige Auswirkung inaktivierter Poliomyelitis-Impfstoffe. HOWE fand 1955 bei Versuchen an Affen und 1962 (40) bei entsprechenden Feldversuchen bei Menschen eine deutliche Reduktion des ausgeschiedenen Virus, dabei war die Virusausscheidung umgekehrt proportional den homologen neutralisierenden Antikörpern, die nach Verabfolgung von inaktiviertem Impfstoff nachgewiesen werden konnten. Auch SALK hält eine reduzierte Virusausscheidung nach erfolgter Konversion (Nachweis neutralisierender Antikörper im Blut der Geimpften) für erwiesen.

Eine Grundforderung für die gute Antigen-Wirksamkeit eines Impfstoffes ist die weitgehende Erhaltung des wirksamen Proteinanteils bei Ausschaltung der Infektiosität.

Wirkung sehr kleiner oder sehr großer Antigenreize

Bei "in vitro" Versuchen läßt sich in Analogie zu den Verhältnissen bei einer Impfung zeigen, daß es auf die Einhaltung bestimmter Dosierungsgrenzen des 1. Antigenreizes ankommt. DRESCHER u. JACHERTS (14) soll die Synthese eines "Antikörper analogen Produkts (AAP)" durch Stimulierung von Peritonealexsudatzellen der Maus mittels Influenzavirus A/Equine - 2/Milford/2/63 gelungen sein. Es handelt sich dabei um einen primären Antigenreiz, mit dem die Tiere gesichert noch nie in Berührung gekommen waren. Dieses mittels empfindlicher Methodik nachgewiesene AAP wurde in deutlicher Abhängigkeit von der Konzentration an Antigen gebildet. Nur ein geringer Teil der in den Kultursystemen enthaltenen Zellen war zur Leistung der Antigenaufnahme und AAP-Synthese befähigt ("effiziente Zellen"). DRESCHER berechnet als optimale Stimulationsdosis ein einziges Antigen-Partikel pro "effiziente Zelle", unter der Voraussetzung, daß alle "effizienten Zellen" in gleicher Weise zur Antigenaufnahme und Antikörper-Synthese befähigt sind. Jenseits der optimalen Dosis tritt durch kleine Erhöhungen der Antigendosis eine überraschend starke Verminderung der AAP-Produktion auf, die als Hemmung der spezifischen Syntheseleistung durch übermäßige Antigenaufnahme durch die "effizienten Zellen" gedeutet wird. Neben der Toxität hoher Antigendosen steht der Erhöhung der Antigendosis eine Begrenzung der Wirksamkeit nach oben entgegen. MAKINODAN e.a. (48) wiesen diesen Effekt bei der Immunisierung von Milzgewebe in vitro mittels verschiedener Serumalbumine nach: "Studien über Immuntoleranz, -paralyse und Indifferenz zeigen, daß eine suboptimale Erstreaktion unter unvorbereiteten oder wenig vorbereiteten Individuen durch eine supraoptimale Antigendosis ausgelöst werden kann. Eine solche Reaktion, die auch durch eine suboptimale Antigendosis verursacht werden kann, ist verbunden mit einem Abfall der Anzahl von immunologisch kompetenten Zellen. Andererseits kann durch eine supraoptimale Antigendosis unter adäquat vorbereiteten Individuen eine suboptimale

Zweitreaktion keineswegs leicht ausgelöst werden. Dieser Unterschied in der Beantwortung einer massiven Antigendosis ... mag beruhen entweder auf einen Unterschied entweder in der Qualität oder Quantität der Antigen resorbierenden, potentiell Antikörper bildenden Zellnachkommenschaft (progenitor cells), oder auch in beidem." SERCARZ u. COONS (63,64) nehmen an, daß zwei aufeinanderfolgende Generationen von progenitor cells (PC) entstehen, deren erste PC₁ empfindlicher ist gegen die toleranzerzeugende Wirkung einer massiven Antigendosis als die differenzierten PC₂-Zellen. Nach Ansicht von MAKINODAN verhalten sich unter günstigen Bedingungen PC₁ : PC₂ = 1 : 100, womit die zur Erzeugung einer Toleranz nötige Antigenmenge wegen der Toxizität hoher Antigendosen schon zu groß wird, um experimentiell bestimmt zu werden. DUTTON hat in vitro solche Zellen der 1. Generation gefunden. Die Aufnahme von C¹⁴-Thymidin durch Milzzellen von vorher mit heterologen Serumproteinen immunisierten Kaninchen ist gesteigert durch die Zugabe des spezifischen Antigens. In bestimmten Zellen der Suspension findet sich eine erhöhte Rate der DNS-Synthese und Zellteilung. Es handelt sich um Blasten-Zellen: große undifferenzierte mononukleäre Zellen, die ca. 1 % der Zellpopulation ausmachen (19). Bei reifen Plasmazellen konnte eine deutliche Proliferation nach Antigengabe bisher nicht nachgewiesen werden. Nimmt man an, daß zur Bildung des spezifisch codierten Antikörper-Proteins eine bestimmte messenger-RNA notwendig ist, so zeigen reife Plasmazellen gegenüber den unreifen Vorstufen (precursor blast cells) eine niedrige Stoffwechselrate (turnover) von RNA. Allerdings inkorporieren sie markierte Aminosäuren in ihr Protein, vermutlich ein Antikörper-Globulin (43,62). Die Plasmazellen als ihrem Wesen nach stabile Endzellen nehmen an der beschleunigten Zellproliferation nach Restimulierung nicht teil (50). Jede Plasmazelle produziert Antikörper nur einer oder weniger begrenzter Spezifitäten (53), andere Befunde deuten jedoch darauf hin, daß dieser energieabhängige Vorgang nur hinsicht-

lich der zur Verfügung stehenden Energie, nicht hinsichtlich der Spezifitäten begrenzt ist. Man versucht die geringe Stoffwechselrate der RNA so zu erklären, daß entweder ein einzelnes Molekül messenger-RNA als Matrix für eine größere Zahl von spezifischen Proteinmolekülen dient, oder das Antigen nur in den abschließenden Faltungsvorgang nach einheitlicher Globulinsynthese eingreift (instruktiv). Falls diese in vitro festgestellten Mechanismen eine Bedeutung für den natürlichen Immunisierungsvorgang haben, so sollte ein Antigen bei seinem ersten Kontakt mit dem Organismus genügend lange im Körper verbleiben, um eine dauernde Umstimmung zu veranlassen, d.h. entweder Blasten-Zellen in ihrer Entwicklung zu beeinflussen oder (bei der protrahierten Desorption aus Depots) genügend viele Zellen instruktiv zu beeinflussen.

Die Bedeutung eines Zuviel oder Zuwenig an Antigenen untersuchte DRESSER am Beispiel der Immunisierung von Mäusen mit Bovin- γ -Globulin (BGG). Eine sehr große Antigendosis erzeugt einen Zustand der Immunparalyse infolge Überladung mit Fremdeiweiss (protein overloading paralysis). Eine Zweitinjektion wird nicht beantwortet (15). Ebenso kann aber durch sehr kleine Dosen einer bestimmten Komponente von BGG ein Zustand immunologischer Reaktionslosigkeit (der von verschiedenen Autoren als "paralysis", "tolerance" oder "unresponsiveness" bezeichnet wird) entstehen (16). Eine anschließende Injektion von BGG in FREUND'schem Adjuvans wird nicht beantwortet. Während reine Salzlösungen dieser Komponente keine Antikörperbildung erzeugen, kommt diese in Anwesenheit kleiner Mengen korpuskulärer Teilchen sofort zustande. DRESSER unterscheidet einen spezifischen, proteinsyntheseerzeugenden Teil und einen korpuskulären, resorptionserzeugenden Teil, der als "adjuvantcity" bezeichnet wird. Die meisten Antigene haben natürliche "adjuvantcity".

Adjuvantien

Einer bloßen Erhöhung der 1. Antigendosis stehen neben prinzipiellen Bedenken auch praktische Schwierigkeiten entgegen. Als günstiger erweist sich die qualitative Veränderung der Verabreichung. Zugabe eines Adjuvans zu Antigenen steigert deren Wirkung bei gleicher Dosis unter bestimmten Bedingungen erheblich. Die Injektion von Impfstoffen in ein altes tuberkulöses Granulom beim Kaninchen erzeugt ungewöhnlich hohe Antikörpertiter. FREUND ahmte diesen Effekt nach durch sein Adjuvans, abgetötete Tuberkelbakterien in Lanolin (1942). Inzwischen ist eine große Zahl von solchen Adjuvantien bekannt, die teils Paraffine (22) oder Mineralöle, teils anorganische Materialien sind. Gemeinsam ist den Adjuvantien ihre hohe Viskosität gegenüber der des Injektionsortes, die zur Hemmung des Abtransports und zur Entstehung einer chronischen Entzündung Anlaß gibt. An der Stelle der Injektion entsteht ein Granulom. HENNEBERG betont in seiner Hypothese von der Bedeutung des Antigendauerreizes (37) das Persistieren des Antigens in den Zellen. Es soll genügend lange Zeit einwirken, um die Zentren der Abwehr dauerhaft zu stimulieren. Nach histologischen Befunden (66) finden sich in einem solchen Granulom Granulozyten, Eosinophile, Plasmazellen, lymphatisches Gewebe und Riesenzellen. Von letzteren wird angenommen, das in ihnen enthaltene Depotmaterial trage an seiner Oberfläche reichlich adsorbiertes Antigen, dessen Persistenz so gesichert ist. "Die Analyse des Aufbaues eines Depots, welches durch die Injektion mit einem optimal zusammengesetzten Impfstoff entstanden ist, gibt die Berechtigung anzunehmen, daß alle Faktoren, die notwendig sind, um ein Antigen zu verarbeiten und ein Zentrum des Immunisierungszustandes und der Antikörperbildung entstehen zu lassen, vorhanden sind (HENNEBERG)*." Auch bei der Injektion synthetischer Kohlenwasserstoffe (69) als Adjuvantien findet man die Granulombildung und Potenzierung des Antigens, obwohl die chemische Natur des verwendeten Stoffes von den anorganischen

* (37)

Adsorbentien völlig verschieden ist. Dagegen kommt es bei dem Lipid Hexadecylamin zu einer akut entzündlichen Reaktion mit Auftreten zahlreicher polymorphkerniger Leukozyten, kaum Makrophagen und Plasmazellen. Die Adjuvanswirkung ist gering (73). Bei der Untersuchung emulgierter Impfstoffe, die als Adjuvans verschiedene in Wasser emulgierte Öle enthielten, kamen McKINNEY u. DAVENPORT (49) zu dem Schluß, daß zur Erreichung eines hohen Anfangsplateaus das verabfolgte Influenza-PR8-Virus mindestens 16 Tage in situ, am Infektionsort, gehalten werden muß. SALK bezeichnete das Impfstoffgranulom als ein "lokales, Antikörper bildendes Organell". Im Gegensatz hierzu nimmt WHITE an, daß es zwar bei der Verwendung inerter Partikel als Adsorbentien zu einer Aufnahme derselben in phagocytierende Zellen und zur Auslösung einer Makrophagen-Reaktion vom Fremdkörper-Typ kommt, also zu einer Verhaftung der Partikel am Injektionsort, aber erst die Freisetzung von Antigen aus dem lokalen Granulom zu einer Stimulierung der immunologisch kompetenten Zellen in den lokalen Lymphknoten führt (72). Vermutlich ist das Überwiegen der histiogenen über die vasale Reaktion Bedingung einer guten Depotwirkung, also die Beteiligung bestimmter Zellentypen des aktiven Mesenchyms. Daneben ist die Teilchengröße wichtig für die Vorgänge der Resorption und Phagozytose. HENNEBERG u. WENGEL (34) fanden sowohl einen Titerabfall bei Exzision von älteren Impfstoffdepots sensibilisierter Tiere, als auch einen Titeranstieg bei Reimplantation bei anderen Tieren. Benutzen sie als Empfänger bereits mit dem homologen Antigen sensibilisierte Tiere, so löste dort das fremde Impfstoffdepot eine deutliche booster-reaktion aus (34). Die Anwesenheit des Depotmaterials ist offenbar wesentlich für die Unterhaltung entsprechend hoher Titer.

Nach erfolgter bindegewebiger Organisierung des Depots lassen sich tierartspezifische Unterschiede im Adsorptions- und Desorptionsverhalten desselben nachweisen (LANGE, 44).

Es wird angenommen, daß der zeitliche und mengenmäßige Verlauf der Adsorption aus einem subcutan gesetzten Depot oder nach subcutaner Injektion in einem konstanten Verhältnis zu dem auf das Erfolgsorgan einwirkenden Antigenreiz steht (11). Findet während der gesamten Versuchszeit ständig eine Resorption statt, so wird dieser Reiztyp als Antigen-dauerreiz bezeichnet (HENNEBERG) (37).

Zweckmäßige Art der ersten Immunisierung

In dieser Arbeit wurde für den Vorversuch ein trivalenter Handelsimpfstoff verwendet, für den Hauptversuch trivalente inaktivierte Impfstoffzubereitungen aus der Herstellung des Robert Koch-Instituts*). Nach Formalin-Inaktivierung und einschließender Dialyse ließ sich zwar das verwendete Poliovirus aus dem Stammimpfstoff nicht mehr anzüchten, doch wurde wegen der erheblichen, für eine Unschädlichkeitsprüfung nötigen Mengen auf diese verzichtet und das Material bis zu Versuchsende wie ein infektiöses behandelt.

Zur Anwendung von Impfstoffen aus inaktivierten Poliomyelitischen Viren werden folgende Forderungen erhoben (56,59):

Da eine einmalige Impfung in keinem Fall einen ausreichenden Schutz erzeugt, sollen mindestens 3 (nach LANGMUIR 4) zeitlich aufeinanderfolgende Impfungen durchgeführt werden. Das Intervall zwischen der 2. und 3. Impfung soll mindestens 7-12 Monate betragen (56), um die Wirkung der 3. Impfung wesentlich zu verbessern. Bis zur 2. Impfung sollen 4-6 Wochen, bis zur 3. mindestens 7 Monate, bis zur 4. in den USA üblichen Impfung 1-2 Monate Abstand sein.

*) für die freundliche Hilfe bei der Herstellung der Impfstoffe danke ich Herrn Dr. J. Drescher und Fräulein K. Schrader.

Nach SALK (60) kommt es weniger auf die Zahl der Impfungen als auf die insgesamt verabreichte Antigenmenge an, da die Höhe des erzielbaren Impfschutzes von der Menge des verabreichten Antigens abhängt.

Durch Erhöhung der ersten Impfstoffdosis kann nach BARNET und BARON (1) und DANE e.a. (9) die Konversionsrate (Prozentsatz der Impflinge mit nachweisbaren Serumantikörpern) erheblich gesteigert werden.

Eine quantitativ unzureichende erste Immunisierung kann aber auch durch wiederholte Nachimpfungen nicht voll ausgeglichen werden, weil der booster-effect (Sekundärphase) von der Antigenmenge abhängig ist, die bei der Erstimpfung verabreicht wurde (60).

Durch die vorliegende Arbeit soll versucht werden nachzuweisen, daß auch eine qualitativ unzureichende erste Immunisierung ein durch später folgende Antigengaben nicht wettzumachendes Versäumnis darstellt.

Unter "Qualität" wird verstanden, in welcher Darreichungsform (bei gleichbleibender erster Dosis) und über welche Zeit das Antigen mit den umzustimmenden Zellen in Kontakt kommt.

VERSUCHE

Erster Versuch zur Feststellung des quantitativen Einflusses der Antigenkonzentration auf die Antikörperbildung beim Meerschweinchen

Wenn, wie behauptet wird, die Menge des bei der Grundimmunisierung verabfolgten Antigens eine vorbestimmende Wirkung (conditioning) auf den weiteren Impferfolg hat, kann dies unter folgenden Bedingungen gezeigt werden: Verabfolgt man einen Impfstoff in 3 fallenden Verdünnungen, so wird der Aufbau der Grundimmunität bei den stärker stimulierten Individuen günstiger sein als bei den schwächer stimulierten. Um diesen latenten Zustand der Grundimmunität beurteilen zu können, benutzt man bei der folgenden Nachimpfung (booster, injection de rappel, stimulus) den erzielten spezifischen Antikörpertiter als ein Maß für die erfolgte immunologische Umstimmung des Individuums. Der Aussagewert solcher Feststellungen ist zunächst auf das verwendete Versuchstier beschränkt und kann beispielsweise für die Standardisierung von Impfstoffen verwendet werden. Dabei bleibt die Frage nach dem tatsächlichen Infektionsschutz offen. Inwiefern nämlich Antikörpertiter und Belastbarkeit durch Infektion korrelieren, wäre nur durch einen Belastungsversuch mit definierter Exposition oder durch Feldversuche zu klären. Zur Prüfung der Wirksamkeit (Antigenität) von Poliomyelitisimpfstoffen werden häufig Meerschweinchen verwendet, zu Wertigkeitsbestimmungen hauptsächlich Affen, weil bei ihnen ein Expositionsversuch mit virulenten Stämmen möglich ist.

Material und Methoden

Trivalenter amerikanischer CONNAUGHT-Impfstoff wurde unverdünnt sowie im Verhältnis 1:5 bzw. 1:10 mit TCM 199 (50a) an Meerschweinchen verimpft (pro Tier 1 ml Impfstoff s.c.). Bei der Auswahl der Versuchstiere wurde auf die Einhaltung einer bestimmten Gewichtsklasse, ein konstantes Geschlechtsverhältnis, guten Gesundheitszustand und ausgewogene Futterzufuhr geachtet. Erkrankungen traten nicht auf, einzelne

Todesfälle waren durch Zwischenfälle bei der Gewinnung von Blutproben bedingt.

Je 6 Tiere wurden in einem Käfig gehalten. 54 Tiere wurden in 3 Gruppen aufgeteilt, je 27 Tiere erhielten die gleiche Grundimmunisierung. Am 28. Tag wurden je 6 Tiere mit gleicher Grundimmunisierung einer Nachimpfung mit den 3 Verdünnungsstufen 1:1, 1:5 und 1:10 unterworfen. Damit erhielt die zweifach mit Originalimpfstoff behandelte Gruppe die größte Antigenmenge.

Zur Bestimmung der Antikörpertiter wurden in bestimmten Zeitabständen Blutproben steril durch Herzpunktion gewonnen, das Serum am gleichen Tag abzentrifugiert (5 min bei 3500 U/min), äquivalente Serumengen von je 6 Tieren (einer Gruppe) zu einem Sammelserum zusammengefaßt und in der Tiefkühltruhe bei -40°C eingefroren.

Nach beendeter Versuchsreihe erfolgte die Titration der Sammelseren im sog. Color-Test*) zum Nachweis neutralisierender Antikörper, vgl. (57), Methode nach SALK, YOUNGER u. WARD. Dabei wird zur Reproduzierbarkeit der Test mit einer Viruskonzentration von 100 ID₅₀ angesetzt und dann abgelesen, wenn bei der mitlaufenden Virustitration die ID₅₀ erreicht ist. Die Ablesung der einzelnen Röhrchen erfolgt mikroskopisch, maßgebend ist das Auftreten des cytopathogenen Effekts (CPE). Festgestellt als Titer wird die höchste Serumverdünnung, die noch vollständige Virusneutralisation zeigt. Die Verdünnung der zu testenden Seren erfolgt in fallenden Potenzen von $2:2^{-2}$, 2^{-3} ... 2^{-n} . Genaues zur Methode in HENNEBERG u. KÖHLER: Praktikum der Virusdiagnostik (26).

Es wurde erwartet, daß in der Gruppe der mit unverdünntem Impfstoff vor- und nachimmunisierten Tiere der höchste Antikörpertiter, in der Gruppe der zweifach mit der 3. Verdünnungsstufe immunisierten Tiere dagegen der niedrigste Antikörpertiter auftreten würde. Die erhaltenen Werte sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

*) Besonderer Dank für die Unterstützung bei der Durchführung des Neutralisationstests gebührt Frau Dr. L. GRÜTZNER, Frau L. MILLBERGER, Fräulein K. STAHLKNECHT und Herrn E. SCHWANZ.

Tab. 1 Ergebnisse von Versuch 1

Wirkung von 2 aufeinanderfolgenden Dosen eines unadsorbierten trivalenten Poliomyelitis-Handelsimpfstoffs in 3 fallenden Konzentrationen, Werte bestimmt aus dem Sammelserum von je 6 Meerschweinchen (n = 6).

		Erst-		Zweitimpfung			
Tage nach Ver-		0	15	27	30	34	50
suchsbeginn							
Grundimmuni-							
sierung mit:							Zweit-
							impfung mit:
Poliovirus							
Typ	I	-	4	4	-	16	4
	II	-	16	8	-	8	16
	III	-	16	-	-	16(32)	-
CONNAUGHT-	I	-	16	8	-	32	4
	Original-	II	-	16	8	32(64)	16(32)
	Impfstoff	III	-	4	-	8	4
	I	-	16(32)	4	-	32	8(16)
	II	-	16	8(16)	4(8)	32(64)	8
	III	-	4(16)	4	16(32)	16(32)	-
	I	-	-	-	-	-	-
	II	-	-	-	-	16	8
	III	-	-	-	-	4	-
1:5 verdünnt	I	-	-	4	-	16	-
	II	-	4	(4)	-	4	32
	III	-	-	-	-	4(8)	-
	I	-	-	-	-	4	-
	II	-	-	-	-	4	-
	III	-	(4)	-	-	8	-
	I	-	8	-	-	16(32)	-
	II	-	8	-	-	8	16
	III	-	8	-	-	16(32)	-
1:10 verdünnt	I	-	16	-	-	16	-
	II	-	8(16)	4	-	16	-
	III	-	-	-	-	-	-
	I	-	4(8)	8	8	16(32)	-
	II	-	8(16)	(4)	4	16	4
	III	-	16	4	4	8	-

Reziproke Titer der neutralisierenden Antikörper im Sammelserum von je 6 Tieren, bestimmt im Neutralisationstest (Colortest) nach SALK e.a. (57)

() Werte = fragliche vollständige Virusneutralisation

In den 3 mit Originalimpfstoff immunisierten Gruppen fallen die insgesamt höheren Werte auf, auch nach der 3-fach abgestuften Nachimpfung. Während nach Grundimmunisierung mit den Verdünnungen 1:5 und 1:10 am 27. und 50. Tag die Antikörper aus dem Blut verschwunden sind, persistieren sie bei den gut vorbereiteten Tieren auch am 50. Tag deutlich. Inwieweit nach einmaliger Antigengabe die Titerhöhe unter den gewählten Versuchsbedingungen anhält, wurde bei zwei parallellaufenden Gruppen festgestellt, die gleichzeitig als Kontrolle dienten.

Tab. 2 Vergleich der Wirkung einer einmaligen Dosis von unverdünntem Poliomyelitisimpfstoff gegenüber 1:10 verdünntem gleichem Impfstoff (vgl. Tab. 1)

Tage nach Versuchsbeginn:		0	15	27	30	34	50	105
Original- impfstoff	Poliovirus Typ I	-	-	4	8	8	8	-
	" II	-	8	16	8	4(16)	8	16
	" III	4	-	16	4	-	-	-
1:10 verdünnt	Typ I	-	4	-	4	4	-	-
	" II	-	(4)	-	4	4	-	-
	" III	4	8	4	-	-	-	-

Während nach ausreichender Grundimmunisierung noch am 105. Tag zirkulierende Antikörper (gegen Typ II) bestehen, wird der Nachweis bei quantitativ unzureichender Antigengabe am 50. Tag negativ.

Kritik

Einer statistischen Auswertung der Tab. 1 steht der geringe Umfang der Stichproben $N = 6$ entgegen, da sich die Titer nach der Zweitimpfung nicht mehr zu größeren Gruppen zusam-

menfassen lassen. Aus dem gleichen Grund ist eine Prüfung der Grundgesamtheiten auf Normalität nicht sinnvoll, obwohl aus ähnlichen Experimenten bekannt ist, daß die Exponenten der Titer (2^{-2} , 2^{-3} ... 2^{-n}) normalverteilt sind. Bei Zugrundelegung verteilungsfreier Toleranzgrenzen (2) liegen bei einem Stichprobenumfang $N = 6$ mit 95 % Vertrauenswahrscheinlichkeit nur 40 % der zugrundeliegenden Grundgesamtheit zwischen dem kleinsten und größten Wert der Stichprobe, selbst bei bekannter Normalität der Stichprobe wären es nur 47 %. Eine Aussage über die Signifikanz der Titerdifferenzen wurde daher nicht gemacht, die Beobachtungen aber zur Planung eines zweiten Versuchs benutzt.

Zweiter Versuch zur Feststellung der Wirkung qualitativ verschiedener Erstreize bei konstanter Antigendosis

Wegen der niedrigen, im ersten Versuch erhaltenen Titer (maximal 1:32 (56) bei unverdünntem Originalimpfstoff) kann zu deren Erhöhung eine größere Antigendosis (quantitativer Weg) oder die Beigabe von Adjuvantien (qualitativer Weg) benutzt werden. Die Adsorption an Aluminium-Phosphat, -Hydroxid oder -Oxid ergibt bei gleichem quantitativen Antigenanteil eine höhere Titerrate bei den immunisierten Tieren. HAAS sagt über die Adjuvans-Eigenschaften des Aluminium-Hydroxid (28): "Alle Beobachtungen sprechen dafür, daß man letztlich nur durch einen Wirksamkeitsversuch Aufschluß darüber erlangen kann, ob ein bestimmtes Aluminium-Hydroxid-Präparat sich als Adjuvans für ein bestimmtes Antigen eignet. Man kann dabei weder von einem Aluminium-Hydroxid auf ein anderes noch von einem Antigen auf ein zweites schließen. Wenn bei einer derartigen Eignungsprüfung noch die optimalen Relationen zwischen Antigen und Adjuvans ermittelt werden sollen, so ergeben sich sehr leicht außerordentlich umfangreiche Versuche." Auch tierspezifische Unterschiede erschweren die Beurteilung.

Bei Meerschweinchen und Kaninchen konnte keine Immunitätssteigernde Wirkung für Poliovirus, Typ I, festgestellt werden (41). Die chemischen Eigenschaften der verschiedenen Aluminium-Hydroxide wurden von WILLSTÄTTER e.a. (68) untersucht. Wegen der Schwierigkeit, sich auf ein bestimmtes Aluminium-Hydroxid zu beziehen, werden die in einem Impfstoff enthaltenen Vol% einer $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Suspension als sog. 2 %iges Aluminium-Hydroxid angegeben, welches in 100 ml eine 2g% Aluminiumoxid entsprechende Menge Aluminium-Hydroxid enthält. Im Virelon $\text{\textcircled{R}}$, dem Poliomyelitis-Adsorbat-Impfstoff der Behringwerke, Marburg/Lahn, liegt entsprechend ein Zusatz des Aluminium-Hydroxid von 3,5 Vol% vor. In diesem Versuch wurde ein erheblich höherer Aluminium-Hydroxid-Anteil gewählt (8,6 Vol%).

Das physikalisch-chemische System von γ -Aluminiumoxid (23) und die Gesetzmäßigkeiten der Antigenadsorption an dieses System sind eingehend untersucht (10,12), es ist möglich, Präparationen von bekannter molarer Oberfläche und Adsorptionskapazität herzustellen. Im Bereich von p_H 6.1 - 7.8 verändert sich die Adsorption nicht, es gilt FREUNDLICHs Adsorptionsisotherme. Dieser Adsorbatimpfstoff wird zur Erzielung optimaler Titerwerte nach DRESCHER (13) bei der Erstimpfung gegeben. Ob die Zweitimpfung mit adsorbiertem oder unadsorbiertem Impfstoff erfolgt, erzeugt keine signifikanten Titerdifferenzen (13). Für den Versuch wurden Konzentration von Al_2O_3 , Gelatinezusatz und p_H entsprechend den Erfahrungen von DRESCHER gewählt.

Ein im Robert Koch-Institut hergestellter trivalenter inaktivierter Impfstoff wurde zur qualitativen Abstufung des Reizes in 3 verschiedenen Zubereitungen verwendet:

- (1) inaktivierter trivalenter Impfstoff unadsorbiert
- (2) gleicher Impfstoff an $\text{Al}(\text{OH})_3$ adsorbiert
- (3) gleicher Impfstoff an Al_2O_3 adsorbiert

Impfstoffherstellung

Durch Formalin in der Wärme (+37°C) wurden aus Kulturfiltraten gewonnene Poliomyelitisviren der Typen I, II und III inaktiviert (150 ml MAHONEY + 110 ml MEF 1 + 100 ml SAUCKETT-Virus) und mit 440 ml TCM 199 (51) verdünnt zu 800 ml unadsorbiertem Stammimpfstoff. Zur Hemmung des Wachstums bakterieller Verunreinigungen wurden dem TCM 199 zugesetzt 100 iE/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin.

Unter Verwendung des unadsorbierten Stammimpfstoffes wurde folgende Aluminium-Hydroxid-Adsorption hergestellt:
210 ml unadsorbierter Stammimpfstoff + 20 ml $\text{Al}(\text{OH})_3$ der Nitrit-Fabrik AG, Feldkirchen b/München, = 230 ml Aluminium-Hydroxid-Präparation.

Unter Verwendung des unadsorbierten Stammimpfstoffes wurde bei pH 6.5 folgende Aluminiumoxid-Adsorption hergestellt:
3345 mg Al_2O_3 Nr. 122 + 13 ml Gelatine + 210 ml unadsorbierter Stammimpfstoff = 223 ml Aluminiumoxid-Präparation mit einem Anteil von 150 mg Al_2O_3 /ml. Die molare Oberfläche des Al_2O_3 betrug 62300 m²/Mol. Die Impfstoffe wurden 30 min maschinell geschüttelt und danach bei 4° im Kühlschrank aufbewahrt.

Zur besseren Kontrolle des Verlaufs wurde die Versuchsperiode auf 120 Tage verlängert und statt einer 2maligen eine 3malige Impfung ausgeführt. Entsprechend den von SALK erhobenen Forderungen lag zwischen 1. und 2. Impfung ein Intervall von 28 Tagen, zwischen 2. und 3. ein längeres (80 Tage). Die dritte Impfung sollte den Nachweis eines möglicherweise latenten Immunisierungszustands (hyperreactive state) ermöglichen. Wird nämlich der Versuch am 50. Tag abgebrochen, so kann bei Abwesenheit demonstrierbarer Serumantikörper das Antigen bereits unwirksam und eine dauerhafte Umstimmung nicht erfolgt sein, es kann sich aber auch um einen latenten Immunisierungszustand handeln. Eine 3. Impfung zeigt dann die Stimulierbarkeit des Individuums. Dabei wird angenommen, wie SALK für die Beziehung zwischen Antikörpertiter und Infektionsschutz gegen Poliomyelitis behauptet, daß bei genügend raschem und hohem Titeranstieg auch im Fall einer Infektion ein Schutz vorliegt.

Versuchsanordnung und -verlauf

Drei verschiedene Präparationen von trivalentem, inaktiviertem Poliomyelitis-Virus-Impfstoff (unadsorbiert, Aluminium-Hydroxid-Adsorption, Aluminiumoxid-Adsorption) wurden an Meerschweinchen verimpft: pro Tier 1 ml Impfstoff s.c. Die Meerschweinchen wurden in Gruppen von 8 Tieren unter gleichen Bedingungen gehalten. Bei der ersten Impfung (Grundimmunisierung) erhielten je 72 Tiere den gleichen Impfstoff. Am 28. Tag erfolgte die Wiederimpfung (Zweitimpfung): je 24 Tiere mit der gleichen Grundimmunisierung erhielten unadsorbierten, $\text{Al}(\text{OH})_3$ - oder Al_2O_3 -Impfstoff, übereinstimmend mit dem Impfschema auf p. 31. Am 108. Tag (Drittimpfung) wurden entsprechend je 8 Tiere erneut mit einer der drei Impfstoff-Präparationen geimpft. Bei 3 Impfstoffen und Impfungen beträgt die Zahl der möglichen Kombinationen $(3)^3 = 27$. Dieses Verfahren ermöglicht die Ermittlung der wirksamsten Reihenfolge der nacheinander verabfolgten Impfstoffe.

Zwei Kontrollgruppen (im Schema auf p. 31 nicht aufgeführt) erhielten nur eine Dosis unadsorbierten Impfstoff 1:1 und 1:10, um einen Vergleich mit dem Handelsimpfstoff aus Versuch 1 zu erhalten. Es wurde erwartet, daß sich eine gute qualitative Grundimmunisierbarkeit durch leichte Stimulierbarkeit auszeichnet.

Blutproben wurden nach einem bestimmten Zeitplan durch Herzpunktion gewonnen,

Erstimpfung			Zweitimpfung		Drittimpfung			(Tage nach Versuchs- beginn)
1			28		108			
0	12	25	29	40	105	109	120	
Herzpunktionen								

äquivalente Serummengen von je 8 Tieren zu einer Probe zusammengefaßt und ihr Antikörpergehalt im Neutralisationstest bestimmt. Die Antikörper gegen die Poliovirus-Typen I-III wurden gleichzeitig in einem Ansatz ermittelt.

Während der Versuchsdauer gingen von den unter gleichen Bedingungen wie im 1. Versuch gehaltenen Tieren nicht mehr als 2 pro Gruppe durch Punktionszwischenfälle oder interkurrente Erkrankungen verloren. Bei der Sektion und histologischen Untersuchung fanden sich keine für Nagetierkrankheiten charakteristischen Organveränderungen. Nach Versuchsende wurden mehrere Impfdepots von Aluminiumoxid-Impfstoff exzidiert und auf bakterielle Sterilität sowie histologisch untersucht (H.E.-Färbung).

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung geschah nach folgendem Schema: Ordnen der erhaltenen Werte nach den 3 Typen von Poliovirus-Antigen und nach der Grundimmunisierung in einer Urliste. *) Bei den Titern handelt es sich um Stufen einer Verdünnungsreihe in fallenden Potenzen von $2(2^{-2}, 2^{-3} \dots 2^{-n})$. Berechnung der (reziproken) geometrischen Mittel aus je 3 Titerwerten (Tab. 3). Die Exponenten der Titerstufen sind normalverteilt (logarithmische Normalverteilung), wie aus anderen Versuchen bekannt ist. Eine Stichprobe vom Umfang $N = 8$ schließt mit 95 % Wahrscheinlichkeit 53 % der Grundgesamtheit ein, bei $N = 24$ sind es 95 %. Der geometrische Mittelwert stellt in diesem Fall eine passende und wirksame Schätzung dar (47).

*) wegen des erheblichen Umfangs nicht angegeben.

Den in Tab. 3 angegebenen Mittelwerten liegt für Typ I-III das gleiche Impfschema zugrunde:

ERST-		ZWEIT-	DRITTIMPFUNG
(1) ⁺		unadsorbiert	(unadsorbiert, $\text{Al}(\text{OH})_3$ oder Al_2O_3)
(2)	unadsorbiert	$\text{Al}(\text{OH})_3$	"
(3)		Al_2O_3	"
(4)		unadsorbiert	(unadsorbiert, $\text{Al}(\text{OH})_3$ oder Al_2O_3)
(5)	$\text{Al}(\text{OH})_3$	$\text{Al}(\text{OH})_3$	"
(6)		Al_2O_3	"
(7)		unadsorbiert	(unadsorbiert, $\text{Al}(\text{OH})_3$ oder Al_2O_3)
(8)	Al_2O_3	$\text{Al}(\text{OH})_3$	"
(9)		Al_2O_3	"

(⁺Die Zeilen (1)-(9) beziehen sich auf je 3 Tiergruppen = 24 Tiere und bilden die Einteilung der Tab. 3 und 4.)

In der Tab. 3 sind unter "Tag 108,120" die Titerwerte von je 3 verschieden geimpften Tiergruppen zusammengefaßt (unadsorbiert, $\text{Al}(\text{OH})_3$, Al_2O_3), da sie sich überschlägig nicht wesentlich unterschieden und wegen der Stichprobengröße eine Signifikanz der Unterschiede nicht nachzuweisen war.

In den Abb. 1-3 sind die mit 3 aufeinanderfolgenden Dosen des gleichen Impfstoffs erhaltenen Titerkurven gegen den Zeitverlauf des Versuchs aufgetragen. Vom Zeitpunkt der Zweitimpfung an erweist sich der Aluminiumoxid-Depotimpfstoff in der Erzeugung hoher Titer deutlich überlegen.

Aus Tab. 3 erkennt man, daß ab der Zweitimpfung die geometrischen Mittel der erzielten Titer innerhalb einer jeden Grundimmunisierungsstufe sich nicht konstant und zum gleichen Zeitpunkt unterscheiden. Die Werte verhalten sich trotz verschiedener Nachimpfung so, als wären sie mit einem gleichartigen Impfstoff erzeugt.

Tab. 3 IMMUNISIERUNG VON MEERSCHWEINCHEN MIT
3 VERSCHIEDENEN ZUBEREITUNGEN VON
INAKTIVIERTEM, TRIVALENTEM POLIO-
MYELITISVIRUS-IMPfstoff

REZIPROKE GEOM. MITTELWERTE $\sqrt[n]{a \cdot b \cdot c}$; n = 3
(berechnet aus je 3 Sammelseren von 8 Tieren;
N = 3.8 = 24)

In der Vorspalte angegeben die Art der
ersten Immunisierung (Grundimmunisierung).
Bezüglich der Art der weiteren Impfungen
vgl. das Impfschema auf Seite 31.

b.w.

	ERST-		ZWEIT-		DRITTIMPFUNG				
Tage nach Versuchsbeginn	0 (1)	12	25	29 (28)	40	105	109 (108)	120	
<u>Grund-</u> <u>immunisierung</u>									siehe p. 31
<u>TYP I</u>									
unadsorbiert	-	2,52	8,0	-	32,0	16,0	20,16	32,0	(1)
	4,0	4,0	12,69	3,18	25,40	10,08	40,32	32,0	(2)
	1,58	5,04	6,35	-	16,0	12,69	16,0	32,0	(3)
Al(OH) ₃	2,52	2,52	4,0	1,58	32,0	25,40	20,16	40,32	(4)
	-	2,0	1,58	2,52	20,16	20,16	20,16	25,39	(5)
	1,58	5,04	2,0	4,0	25,40	25,40	25,16	25,39	(6)
Al ₂ O ₃	1,58	5,04	1,58	25,40	512,0	128,0	50,79	161,27	(7)
	-	5,04	2,52	12,69	102,60	161,27	40,32	80,18	(8)
	-	3,18	8,0	20,16	128,0	102,60	32,0	161,27	(9)
<u>TYP II</u>									
unadsorbiert	-	12,69	16,0	10,08	50,79	40,32	10,08	32,0	(1)
	-	16,0	10,08	8,0	20,16	20,16	32,02	25,40	(2)
	-	10,08	2,0	10,08	20,16	32,02	40,32	50,79	(3)
Al(OH) ₃	-	6,35	2,52	2,0	25,40	40,32	64,0	25,40	(4)
	-	12,69	6,35	8,0	25,40	25,40	25,40	25,40	(5)
	-	10,08	12,69	12,69	16,0	40,32	12,69	25,40	(6)
Al ₂ O ₃	-	8,0	4,0	32,0	406,37	102,60	25,39	101,50	(7)
	-	3,18	4,0	25,40	322,50	80,18	40,32	161,27	(8)
	-	10,08	12,69	25,40	203,14	80,18	40,32	128,0	(9)
<u>TYP III</u>									
unadsorbiert	1,58	1,58	20,16	-	3,18	4,0	4,0	25,40	(1)
	1,58	-	20,16	-	5,04	4,0	8,0	7,99	(2)
	1,58	1,58	2,52	-	4,0	4,0	12,69	32,0	(3)
Al(OH) ₃	-	4,0	2,52	2,52	10,08	5,04	4,0	20,16	(4)
	1,58	4,0	1,58	2,52	5,04	5,04	6,35	25,40	(5)
	2,52	1,58	3,18	2,52	6,35	6,35	8,0	8,0	(6)
Al ₂ O ₃	1,58	4,0	4,0	6,35	12,69	6,35	6,35	40,32	(7)
	2,52	2,52	4,0	4,0	8,0	6,35	5,04	50,79	(8)
	-	8,0	2,52	6,35	10,08	10,08	6,35	64,0	(9)

Tab. 4

SIGNIFIKANZPRÜFUNG DER TITERDIFFERENZEN DER
GEOM. MITTELWERTE

(berechnet nach dem DUNCAN-Test; $2\alpha = 0,05$)

= signifikant gleich
<> signifikant verschieden
HΛV gilt für übereinanderstehende Werte

		Erst-		Zweit-		Drittimpfung				
Tage nach Versuchsbeginn		0 (1)	12	25 (28)	29	40	105	109 (108)	120	
Grund- immunisierung										siehe p. 31
<u>TYP I</u>										
unadsorbiert	1,85	2,72	8,64	-	52,0	= 16,0	= 20,16	= 32,0	(1)	
				-	25,40	= 10,08	< 40,32	= 32,0	(2)	
				-	16,0	= 12,69	= 16,0	= 32,0	(3)	
				1,58	< 32,0	= 25,40	= 20,16	< 40,32	(4)	
Al(OH) ₃	1,58	3,17	2,33	2,52	= 20,16	= 20,16	= 20,16	= 25,39	(5)	
				4,0	< 25,39	= 25,40	= 20,16	= 25,39	(6)	
				25,39	< 512,0	> 128,0	= 50,79	< 161,27	(7)	
Al ₂ O ₃	1,17	- 3,32	7,17	12,69	< 101,50	= 161,27	> 40,32	= 80,65	(8)	
				20,16	< 128,0	= 101,50	> 32,0	< 161,27	(9)	
<u>TYP II</u>										
unadsorbiert	-	10,08	6,35	10,08	< 50,79	= 40,32	> 10,08	< 32,0	(1)	
				8,0	< 20,16	= 20,16	= 32,0	= 25,39	(2)	
				10,08	< 20,16	= 32,0	= 40,32	= 50,79	(3)	
				2,0	< 25,40	= 40,32	= 64,0	= 25,39	(4)	
Al(OH) ₃	-	9,33	5,88	8,0	< 25,40	= 25,40	= 25,40	= 25,39	(5)	
				12,69	= 16,0	< 40,32	> 12,69	= 25,39	(6)	
				32,0	< 406,37	> 101,50	> 25,39	< 101,50	(7)	
Al ₂ O ₃	-	6,35	5,88	25,39	< 320,50	> 80,65	= 40,32	< 161,4	(8)	
				25,39	< 203,14	= 80,65	= 40,32	< 128,0	(9)	
<u>TYP III</u>										
unadsorbiert	1,58	1,36	10,08	-	3,18	= 4,0	= 4,0	< 25,39	(1)	
				-	5,04	= 4,0	= 8,0	= 8,0	(2)	
				-	4,0	= 4,0	< 12,69	< 32,0	(3)	
				2,52	< 10,08	= 5,04	= 4,0	< 20,16	(4)	
Al(OH) ₃	1,58	3,17	2,33	2,52	= 5,04	= 5,04	= 6,35	< 20,16	(5)	
				2,52	= 6,35	= 6,35	= 8,0	= 7,99	(6)	
				6,35	= 12,69	= 6,35	= 6,35	< 40,32	(7)	
Al ₂ O ₃	1,58	3,70	3,43	4,0	< 8,0	= 6,35	= 5,04	< 50,79	(8)	
				6,35	= 10,08	= 10,08	= 6,35	< 64,0	(9)	

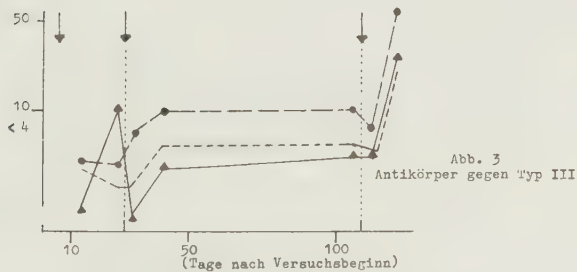
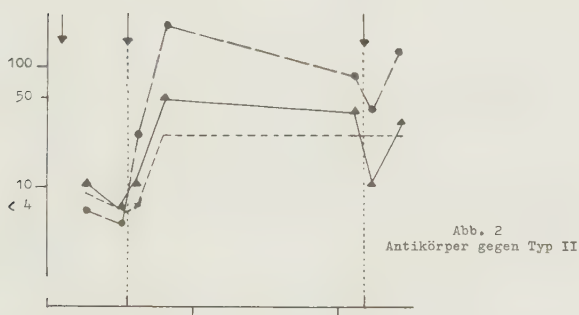
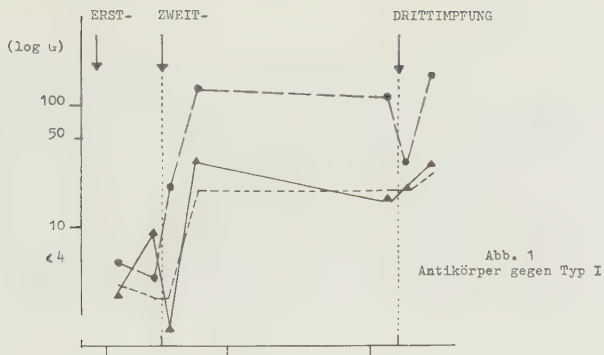


Abb. 1-3 WIRKUNG VON 3 NACHEINANDER VERABFOLGTEN DOSEN EINES TRIVALENTEN POLIOMYELITIS-IMPfstOFFES. UNADSORBIERTER IMPfstOFF VERGLEICHEN MIT AN 8,6 Vol % ALUMINIUM-HYDROXID ODER AN ALUMINIUMOXID (150 mg/ml) ADSORBIERTEN GLEICHEN ANTIGENMENGEN.

Reziproke geometrische Mittelwerte G der Antikörpertiter gegen Poliovirus-Typ I - III

----- unadsorbiert
 ————— an $\text{Al}(\text{OH})_3$
 - · - · - an Al_2O_3

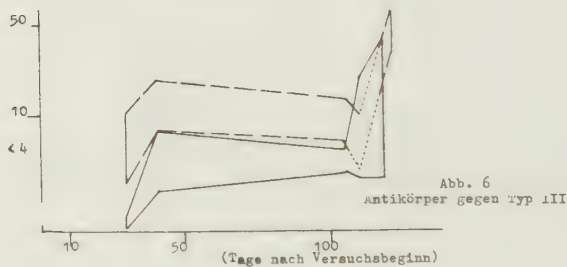
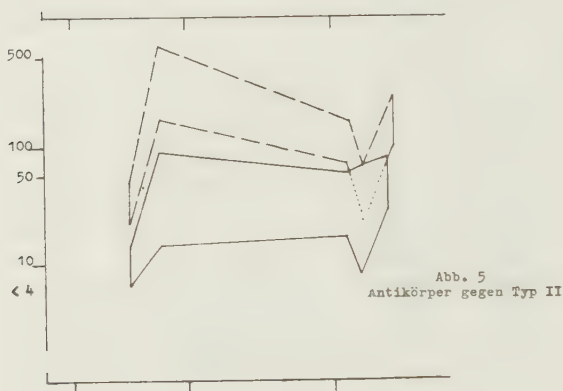
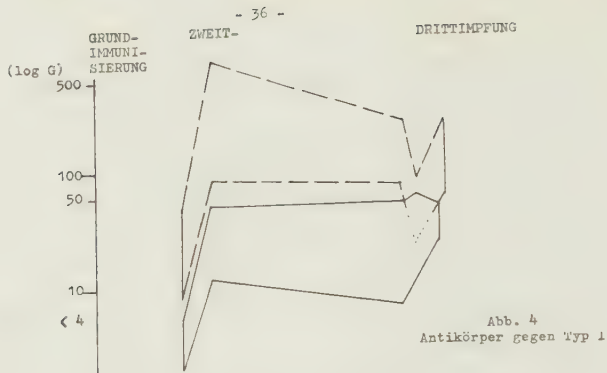


Abb. 4-6 ERFOLG WEITERER IMPFUNGEN MIT 3 VERSCHIEDENEN TRIVALENTEN IMPFSTOFFEN (unadsorbiert, an Aluminium-Hydroxid, an Aluminiumoxid) NACH EINHEITLICHER GRUNDIMMUNISIERUNG (Grundimmunisierung mit $Al(OH)_3$, der Übersichtlichkeit halber nicht eingezeichnet.)

Antikörpertiter gegen Poliovirus Typ I - III
Variationsbreite der geom. Mittelwerte G
einschl. der Standardabweichung.

Grundimmunisierung mit an Al_2O_3 adsorbiertem Impfstoff
 Grundimmunisierung mit unadsorbiertem Impfstoff

In den Abb. 4-6 ist als Maß der Stimulierbarkeit nach einheitlicher Grundimmunisierung die Variationsbreite der mit 3 verschiedenen Impfstoffen ab der Zweitimpfung erzielten Titer gegen den Zeitverlauf aufgetragen. Bei nicht zu großem Stichprobenumfang ist die Variationsbreite ein brauchbares Streuungsmaß. Man bemerkt, daß nach Grundimmunisierung mit Al_2O_3 -Impfstoff die erzielbaren Titer deutlich höher und außerhalb der Spannweite der mit unadsorbiertem Impfstoff erzielten liegen.

Zu Tab. 4: Je 3 Mittelwerte unter "Tag 0 ... 27" sind mit dem gleichen Impfstoff erzeugt und zusammengefaßt. In einer Varianzanalyse mit Hilfe der F-Verteilung von FISHER (21) wurden die Titerwerte unter "Tag 29 ... 120" auf ihre Verschiedenheit untersucht, bei Ablehnung der Nullhypothese die Signifikanz ihrer Differenzen bestimmt. Von den zur Verfügung stehenden Verfahren wurde DUNCANS "new multiple range test" verwendet (17,18,30), da es beim multiplen t-Test in Verbindung mit dem F-Test zu einem Informationsverlust kommen kann (67) und der NEWMAN-KEULS-Test (42,52) eine für die Beurteilung der vorliegenden Unterschiede unnötige Trennschärfe (power) hat. Die in der Gewinnung eines Sammelserums liegende Wahrscheinlichkeit (Ausgleich der Einzeltiter verschiedener Tiere) ist in der Rechnung nicht berücksichtigt, so daß die tatsächliche Signifikanzwahrscheinlichkeit größer sein dürfte als die verwendete (95 %).

Ergebnisse

Tab. 3: Vor Versuchsbeginn sind die Titer in allen Fällen kleiner als 1:4. Entsprechend der Fehlerbreite des Neutralisationstests von ± 1 Titerstufe darf gefolgert werden, die Tiere seien noch nicht sensibilisiert gewesen. Auch als Kontrollen mitgeführte hochtitrige Immunseren von bekanntem Antikörpergehalt schwankten während der Durchführung des

Neutralisationstests um eine Titerstufe. Am 12. Tag sind alle Tiere gegen Poliovirus-Antigen-Typ I und II sensibilisiert. Gegen Typ II bestehen die höchsten Titerwerte, die am 25. Tag noch gut persistieren. Dieses Verhalten der Antigenwirksamkeit der drei Typen von Poliovirus zueinander ist auch sonst bei Poliomyelitis-Impfstoffen zu beobachten. Unterschiede in der Wirksamkeit der 3 Impfstoffzubereitungen sind bis zum 25. Tag nicht aufgetreten (s. auch Tab. 4: Signifikanz der Titerdifferenzen).

Nach der Zweitimpfung am 28. Tag ist am 29. Tag zunächst ein deutliches initiales Titerdefizit nachweisbar, das als Depression aufzufassen ist. Dieses Defizit fehlt jedoch für die Al_2O_3 -Gruppe. Die Komplexbildung vorhandener Antikörper mit zugeführten Antigenen (von HENNEBERG 1948 (33) an einem anderen Modellfall als Ursache des initialen Defizits beschrieben) und die Stimulierung der Proteinsynthese durch erleichterte Aufnahme in kompetente Zellen ist vermutlich in weniger als 24 Stunden abgelaufen, so daß die Titerkurve bereits wieder im ansteigenden Verlauf getroffen ist. Es handelt sich wahrscheinlich nicht um einen Effekt, der einem bestimmten Impfstoff zuzuordnen ist, da nach Drittimpfung ein deutlicher Titerabfall am 109. Tag in der gleichen Gruppe auftritt. Am 40. Tag bestehen bereits sehr auffällige Unterschiede zwischen den Grundimmunisierungsgruppen. Die Al_2O_3 -Gruppe zeigt für Typ I und II um 2-4fach höhere Titerstufen als die unadsorbierte und an $Al(OH)_3$ adsorbierte Zubereitung. Die Nachimpfung mit unadsorbiertem Impfstoff scheint die besten Ergebnisse zu liefern - s. die Zeilen (7) in Tab. 3 und 4 -, doch läßt sich ein signifikanter Unterschied nur für Typ I sichern. Am 105. Tag bestehen keine signifikanten Unterschiede mehr für Typ I und II. Trotz Zweitimpfung mit 3 qualitativ verschiedenen Impfstoffen verhalten sich die Titer innerhalb jeder Grundimmunisierungsstufe so, als wären sie mit demselben Impfstoff erzielt (Tag 40,105,120).

Da sich mit der geforderten Signifikanzwahrscheinlichkeit ein unterschiedlicher Erfolg der verschiedenartigen Nachimpfungen nicht sichern ließ, wird angenommen, daß sich der Titer nach erfolgter Umstimmung nur nach der Menge des verabreichten Antigens ändert und diese Reaktion ein Maß der erfolgten Umstimmung darstellt.

Nach der Drittimpfung am 108. Tag tritt eine initiale Depression nur bei der Al_2O_3 -Gruppe auf. Für die anderen zwei Gruppen mag die oben angegebene Erklärung gelten, daß Komplexbildung und Anregung der Antikörper-Synthese in weniger als 24 Stunden ablaufen. Am 120. Tag schließlich erzielt die Al_2O_3 -Gruppe (i.e. Grundimmunisierung) für alle 3 Typen Titer, die wieder erheblich über den Durchschnitt der anderen Gruppen liegen. Typ III setzt sich gegenüber I und II deutlich durch, es stellt sich ein Immunisierungsgleichgewicht zwischen den 3 Virustypen ein. Von einer statistisch gesicherten Überlegenheit der Al_2O_3 -Gruppe kann aber für Typ III nicht gesprochen werden. Die Titer für Typ I und II liegen am 120. Tag um 1-2 Titerstufen über denen der beiden anderen Gruppen (unter Berücksichtigung der Standardabweichung). Bei den nur einmal geimpften Kontrollgruppen entsprach der Verlauf dem Versuch 1. Bei Verdünnung des unadsorbierten Impfstoffs auf 1:10 wird am 50. Tag der Nachweis zirkulierender Antikörper negativ, bei unverdünntem Impfstoff sind nach 120 Tagen für Typ I und II Antikörper noch vorhanden (1:4, 1:16). Die Grundimmunisierung mit Al_2O_3 -Depotimpfstoff erzeugt offenbar beim Meerschweinchen eine dauerhafte Umstimmung der Antikörper-Synthese hinsichtlich des verwendeten, spezifischen Antigens. Die Titer am 40., 105., 120. Tag, wenn der Antikörpertiter auf einer relativ konstanten Höhe bleibt (Plateau), sind bei Al_2O_3 erheblich höher als bei den verglichenen Impfstoffen.

Beurteilung der Versuchsergebnisse

Es bedarf offenbar eines bestimmten, nicht allein von der verabreichten Antigenmenge abhängigen Reizes, um die Fähigkeit zu dauerhafter Antikörpersynthese gegen Poliovirus-Antigen hervorzurufen. SALK nennt als Grundforderung für eine wirksame Immunisierung die initiale Umstimmung einer genügenden Anzahl Antikörper bildender Zellen und den Bestand ihrer Nachkommenschaft (58). Er meint, daß sich der maximale erreichbare Antikörper-Titer nach drei - viermaliger Impfung mit einem unadsorbierten Impfstoff erreichen läßt (60), und zeigt, daß bei halblogarithmischer Auftragung der Antikörper-Titer linear mit der Zahl der verabfolgten Dosen ansteigt. Dieser Antikörper-Titer wird als Ausdruck einer optimalen immunisierenden Wirkung angesehen. Eine kleine Erstdosis hätte zwar den Nachteil, zunächst geringe Antikörper-Titer zu erzeugen, könnte aber durch geeignete Nachimpfung wettgemacht werden. Zur Erreichung einer guten Umstimmung müßte der Antigengehalt der ersten (unadsorbierten) Dosis möglichst hoch sein. Zur Wirkung kleiner Antigenmengen führt SALK einschränkend aus (58): "Obgleich ein Zustand immunologischer Sensibilisierung durch einen geringen antigenen Reiz hervorgerufen werden kann, wird ein derartiger Zustand besser und sicherer durch eine starke antigene Einwirkung erzielt. Man meint deshalb zu dem Schluß berechtigt zu sein, daß man auch bei einigen Menschen nur eine dauerhafte Immunität erreichen kann, wenn man einen guten und wirksamen antigenen Reiz setzt." Hängt aber, wie DRESCHER nachwies, die initiale Umstimmung auch von der angebotenen Teilchengröße (13) und von der Zeit ab, in der eine bestimmte Antigenkonzentration an den Reaktionszentren vorliegt, so müßten sich deutliche Unterschiede zwischen der Wirkung unadsorbierter und adsorbierter Impfstoffe ergeben. Eine nur quantitativ starke antigene Einwirkung wird kein optimales Ergebnis erzeugen.

Tatsächlich genügt in diesem Versuch die Grundimmunisierung mit unadsorbiertem Poliomyelitis-Impfstoff nicht, um eine ausreichende Stimulierbarkeit bei weiteren Impfungen zu erzeugen. Unadsorbierter Impfstoff setzt einen kräftigen, kurzdauernden ersten Reiz. Der Impfstoff wird durch seine geringe Viskosität (Überwiegen der wässrigen Phase) rasch vom Applikationsort transportiert, und ein Teil des verabfolgten Antigens fällt unspezifischen Abbau- und Ausscheidungsmechanismen anheim. Infolge der raschen Verteilung und Elimination, also Ausscheidung, steht nur ein Bruchteil der Gesamtmenge längere Zeit an den angenommenen Reaktionszentren zur Auslösung einer Umstimmung zur Verfügung.

Das Versäumnis einer unzureichenden Grundimmunisierung lässt sich im vorliegenden Versuch nicht nachholen, auch bei Verwendung des geeigneten Adsorbatimpfstoffs zur Nachimpfung steigen die Titer nicht mehr an als bei unadsorbiert geimpften Kontrollen.

Nach der zweiten und dritten Impfung konnte ein Unterschied in der Wirkung von unadsorbiertem und Aluminiumoxid-Adsorbat-Impfstoff nicht gesichert werden.

Es wird angenommen, daß der zur Auslösung einer stabilen Grundimmunität benötigte Reiz von dem zur Erhaltung der Immunität nötigen verschieden ist.

Letzterer kann durchaus von kurzer Dauer sein, da es nur auf eine Auffrischung ankommt, vielleicht sogar das zugeführte Antigen besser aufgenommen und verhaftet (trapped) wird.

Bei der Auffrischung bestehen offenbar günstigere Bedingungen, da der hyperreaktive Zustand das Immunsystem zur Antigenaufnahme binnen kurzer Zeit befähigt. Der erste Reiz soll aber genügend lange Zeit einwirken, wobei die Adsorption an ein Material günstig erscheint, das am Injektionsort eine Gewebsreaktion auslöst, die zu innigem und anhaltendem Kontakt mit mesenchymalen Zellen führt. In der an $\text{Al}(\text{OH})_3$ adsorbier-ten Zubereitung kann das Depotmaterial Aluminiumhydroxid im vorliegenden Fall aus tierartspezifischen Gründen seine Depotwirkung nicht entfalten. Die gewählte Konzentration von 8,6 Vol% wirkt sich ungünstig auf die Adsorption aus (vgl. 27,41).

Nach Versuchsende wurden einige Depots von Aluminiumoxid-Adsorbat entfernt und ihr Inhalt auf bakterielle Sterilität geprüft. Es ließen sich keine Keime, insbesondere keine Eitererreger anzüchten. Während der Versuchszeit wurde bei erneuten Gaben von Depotimpfstoff keine lokale Überempfindlichkeit der Injektionsstelle gesehen. Histologische Schnitte zeigten granulomatösen Aufbau der Depots, eine dichte Bindegewebskapsel mit histiozytärer Reaktion auf das Fremdmaterial und zahlreichen Riesenzellen, vgl. (66).

ZUSAMMENFASSUNG

Am Beispiel der Impfung von Meerschweinchen mit verschiedenen inaktivierten, trivalenten Poliomyelitisimpfstoffen wurde die Bedeutung des 1. Antigenreizes in Qualität und Quantität für die weitere Immunisierbarkeit des Individuums untersucht. Bei Gabe der Verdünnung eines handelsüblichen Impfstoffs 1:10 verschwanden wenige Tage nach Erst- und Zweitimpfung die zirkulierenden Antikörper wieder aus dem Blut, bei dem unverdünnten Impfstoff persistierten sie. Eine kurzdauernde booster-Reaktion nach der 2. Impfung trat jedoch auch bei dem verdünnten Impfstoff auf.

Bei Immunisierung mit drei verschiedenen wirksamen Antigenzubereitungen konnte trotz verschieden ausgeführter Zweit- und Drittimpfung kein Einfluß der Nachimpfung auf die Antikörperbildung der booster-Phase nachgewiesen werden. Die Tiere verhielten sich, als hätten sie einen einheitlichen 2. Reiz erhalten. Bis zur zweiten Impfung traten zwischen den 3 verwendeten Impfstoffen keine nachweisbaren Unterschiede in der Wirksamkeit auf, danach zeigte sich der zur Grundimmunisierung verwendete Aluminiumoxid-Adsorbatimpfstoff dem inaktivierten unadsorbierten und dem in offenbar ungeeigneter und beim Meerschweinchen nicht wirksamer Konzentration verwendeten Aluminium-Hydroxid-Adsorbatimpfstoff in der Erzeugung hoher Titer deutlich überlegen. Die Unterschiede sind statistisch gesichert. Es war dabei bedeutungslos, mit welchem der 3 Impfstoffe nachgeimpft wurde. Die erzielten absoluten Titer waren generell am höchsten für Typ II, dicht gefolgt von Typ I, während das Verhalten von Typ III inkonstant blieb und die niedrigsten absoluten Titer ergab. Diese Beobachtungen stimmen überein mit den Befunden von HENNEBERG e.a. (38) und DRESCHER (13).

